

A kutatás előzményei és célkitűzése

Számos növényfaj esetében ismeretes, hogy közép-európai, mérsékelt égövi körülmények között áttelelésük bizonytalan illetve változó. Ennek alapja jelentős mértékben az időjárás, másrészt viszont –ezzel együtt– az adott taxonnak az a képessége is, milyen mértékben képes elviselni a kedvezőtlen téli körülményeket. Legfontosabb gazdasági növényeink közül az őszi gabonák, az őszi káposztarepce, de kertészeti kultúrák közül a kétéves zöldség- és dísnövények esetében is– az áttelelés során végbemenő vernalizáció egyben a generatív szervek fejlődésének is alapfeltétele, ami döntő elem a technológia során.

Gyógynövény fajok közül az áttelelés különböző szempontból érinti az egyes fajokat. A földbeni szerveikkel vagy fásodó hajtásaikkal áttelelő, évelő fajok a legtöbb esetben kevésbé veszélyeztetettek, még mediterrán eredetű növények is igen nagy biztonsággal áttelelnek és termést hoznak hazánkban (pl. édeskömény, izsóp, levenula). Más a helyzet a kétéves életformájú fajokkal, melyek a virágzatok iniciálódásához hideghatást igényelnek (pl. kétéves konyhakömény, szöszös ökörfakkóró). Ilyenkor a tölevélrózsa megfelelő fejlettsége szükséges az átteleléshez, s egyben a hatékony vernalizációhoz. Néhány más faj azonban mind őszi, mind tavaszi vetésben megfelelően fejlődik, virágzik és termést hoz. Ezeket a növényeket őszi-tavaszi életciklusúként is jellemezhetjük (pl. kamilla, mák). Egyéves fajok, virágzásukhoz hideghatást nem, csak hosszúnappalos körülményeket igényelnek. A gyakorlati tapasztalatok szerint ezek a növények az őszi keléssel meghosszabbodott vegetációs idő folytán a következő évben nagyobb biomassza hozamra képesek, mint ugyanazon genotípus tavaszi kelése után. Az őszi kelés után az áttelelést nagyban befolyásolja a növény optimális fejlettsége, amit termesztés során csak bizonyos mértékig tudunk befolyásolni. A fejlettség mellett a téli időjárás (hőmérséklet, csapadék) és a növény genetikai adottságai jelentik a döntő faktorokat.

Ahhoz tehát, hogy eredményes őszi-tavaszi ciklusú termesztést és nagy hozamokat érjünk el, számos tényezőt kell figyelembe venni.

A külső, agrometeorológiai faktorok közül meghatározó a hőmérséklet abszolút értéke, de emellett a lehülés üteme is, továbbá a tél folyamán előforduló lehülési-felmelegedési ciklusok. A hótakaró jelenléte és vastagsága klímánkon szignifikánsan hozzájárul az áttelelés sikeréhez, ugyanakkor a megfagyott, levegőtlen hórég csaknem biztos pusztulást okoz. Szabadföldön a talajtípus és a talajállapot, de gyakran még az enyhébb domborzati eltérések is nagyban befolyásolják a növények áttelelésének sikerét. Emiatt in vitro tesztek eredményeinek értékelésekor és a szabadföldi körülményekre való alkalmazásakor igen körültekintően kell eljárni.

A növénynek megfelelő, -az adott fajra specifikus- fejlettségi fázist kell elérni, hogy a genetikailag öröklött védőmechanizmusok fenotípusosan megnyilvánulhassanak. Ebben a fázisban az edződési periódusban a növény számos biokémiai-élettani folyamattal készül fel a fagyhatás okozta stresszállapatra. A fagy károsítása részben a jégkristályok képződésének fizikai, részben pedig azok ozmótikus hatásában nyilvánul meg. Ezért az edződés során csökken a szövetek víztartalma, átalakul a plazmamembránok szerkezete, a sejközötti járatokban krioprotektánsok halmozódnak fel, akadályozva a jégkristályok képződését, a sejten belül pedig ozmoprotektánsok, a vízvesztés hatásainak kivédésére. A citoplazma dehidrált állapota jelentősen magalapozza a fagyűrész mértékét (Palva et al., 2001). Az a faj/fajta, amely kevésbé viseli el a jelentősen dehidrált állapotot, érzékenyebbnek bizonyul a hideggel szemben (Wisniewski et al., 1997). A különböző biokémiai markermolekulák közül a legtöbb szakirodalom az oldható cukrokat (szénhidrátokat), védőfehérjéket („dehidrin”), aminosavakat és a membránok felépítésében résztvevő telítetlen zsírsavakat említi. Az aminosavak közül is kiemelkedik a prolin, amely mellett, hogy szerepet játszik az ozmoregulációban, hozzájárul a sejszerkezet stabilizálásához is, továbbá részt vesz a sejtek és

szövetek redox potenciáljának szabályozásában, s ezzel szignálmolekulaként serkenti a védekező reakciókat (Hare et al., 1998). A membránkárosodás elkerülését szolgálják a szabadgyökök hatásait közömbösítő antioxidáns enzimek és egyéb vegyületek (pl. fenoloidok). A felkészülésben –mint más stresszek esetében is-, jelentős szerepet tulajdonítanak az abszcizinsavnak.

A védekező folyamatok alapvetően genetikailag szabályozottak, és sokrétű, komplex mechanizmusokat ölelnek fel. A genetikai determináció legrészletesebben a téli gabonák – elsősorban a búza – esetében ismert. A védőanyagok szintézisének regulációja transzkripciós faktorok közreműködésével, több lépcsőben zajlik, és szorosan összefügg a vernalizációs szabályozással is (Galiba et al., 2008).

A különböző fajokban az egyes fajták fagyűrése –a gyakorlatban: télállósága- egészen eltérő lehet, s ezzel összefüggésben az eredményes edződési időtartam és hőmérséklet is változhat.

A mák (*Papaver somniferum*) esetében mindezek a tényezők gyakorlatilag ismeretlenek. Tudományos kutatást a jelen programunk előtt ezirányban célzottan nem folytattak, alapvető ismereteink a termesztési gyakorlatból származnak. OTKA munkatervünk összeállítása során tehát más fajokkal kapcsolatban felhalmozódott és általánosítható ismeretekből indultunk ki.

A pályázati munka a nemzetközi vonatkozásban is számon tartott és egyben eredményes hazai mákkutatás szerves folytatása volt. Ebben a korábban elhanyagolt területként kezelt, de gyakorlati szempontból rendkívül fontos témát, az őszi-tavaszi ciklusú mákpopulációk kémiai és genetikai sajátosságainak jobb megismerését tűztük ki célul. Tisztázni kívántuk az „őszieség” és az alkaloidmentesség öröklődésének törvényszerűségeit, feltárni e két tulajdonság kapcsolatát, és előállítani a gyakorlat számára ígéretes új vonalakat.

A vizsgálatok módszere

A munka során tíz mákfajtát illetve szelektált törzset választottunk ki, amelyek ismert életciklusuknál és stabil alkaloidtartalmuknál fogva várhatóan jó alapot nyújtottak a fenti vizsgálatokhoz. Ezek többirányú jellemzését végeztük el, illetve használtuk fel a tesztelendő reciprok keresztezési kombinációk előállításához. Eszerint az alábbi keresztezéseket végeztük el (ld. részjelentés, 2006-07):

- Karakteresen alacsony (max. 1‰) összalkaloid-tartalmú tavaszi* ('Przemko', 'Ametiszt' fajták, 1/172 sz. szelektált törzs) és őszi* ('Leila' fajta, 'Kozmosz' fajta) taxonok között;
- Jellegzetesen magas (kb. 20 ‰) összalkaloid-tartalmú tavaszi ('Minoán', 'Medea') és őszi ('Kozmosz' fajta, 67sz. szelektált törzs) taxonok között;
- Karakteresen magas (20 ‰ felett) narkotin tartalmú tavaszi ('Korona' fajta) és őszi magas hatóanyagú ('Kozmosz' fajta; 67sz. szelektált törzs) taxonok között.
- Kontrollként egyes vizsgálatokban szerepeltettünk egy újabb őszi fajtát, a 'Zeno'-t is.

A keresztezéseket és az utódnemzedékek tesztelésének nagyobb részét szabadföldi kísérletekben folytattuk. A kísérleti állományok vetése 2006 és 2007 tavaszán (szülőfajták), 2008 tavaszán (F1), 2008 őszén és 2009 tavaszán (F2) történt a soroksári kísérleti üzemünkben. A keresztezéseket kasztrálás előzte meg, majd a virágokat leszigeteltük. A továbbiakban e kombinációk F1 és F2 utódnemzedékeit vizsgáltuk a fagyűrés és az alkaloidtartalom szempontjából, összehasonlítva a szülői anyagokkal is. Egyes kombinációkban a szélsőséges fenológiai sajátosságok miatt (virágzási idő 20-25 napos eltolódása) a keresztezés csak rendkívül kis utódszámot eredményezett, így ezeket –bár minden esetben továbbvittük, - a következtetések levonásakor nem számítottuk be.

Az alkaloid analitikai vizsgálatokat a korábban leírt módszerrel végeztük (Németh et al., 2002), a metaxénia elkerülése végett mindig szigetelt tokokból.

A fagyűrési tesztekhez valamint a biokémiai markerek analíziséhez végzett in vitro vizsgálatok módszereit a továbbiakban, az eredmények ismertetése előtt közöljük.

* A továbbiakban az „ősz” fajta alatt az őszi-tavaszi vegetációs ciklusú, fagytoleráns taxonokat értjük, míg „tavaszi” fajta néven a tavaszi életsiklusú, fagyérzékeny anyagokat említjük.

Eredmények

1. A mák fagytoleranciájának jellemzése

1.1. In vitro fagyteszt kidolgozása

A fagyűrési vizsgálatokhoz munkatervünkben szerepelt egy olyan hidegtűrési in vitro program kidolgozása, ami lehetővé teszi az „ősz” illetve „tavaszi” jellegű genotípusok megbízható, gyors elkülönítését. A kísérletek során az alábbi kérdéseket kellett tisztáznunk:

- a./ milyen fejlettségi fázisban álló növényt használjunk;
- b./ szükséges-e, s ha igen, milyen teszt hőmérsékleten és milyen hosszán történjen az edzés
- c./ milyen teszt hőmérsékleten és milyen hosszán történjen a fagyűrési tesztelése,
- d./ milyen körülmények között és milyen sokáig célszerű regeneráltatni a növényeket.

Kiindulási információként csak a gyakorlati tapasztalatokat tudtuk felhasználni, hiszen a mák fagyűrésének a szakirodalomban az alapjai sem ismeretesek. E gyakorlati tapasztalatok szerint a mák akkor telel legnagyobb eséllyel, ha szeptember végén vetik és 3-4 lomblevelés állapotot ér el a tél beálltaig, továbbá az erős (?) fagyok idején hótakaró védi. Ennél több információt a gabonák fagyűrésének vizsgálatáról szóló közleményekből nyerhettünk (pl. Galiba et al., 2008), ahol ismert, hogy alacsony megvilágítás mellett a hidegedződés kevésbé hatékony. A fény és a hidegtűrési regulációjának összefüggése persze esetünkben kérdéses, mivel a mák a generatív differenciálódáshoz nem igényel vernalizációt.

A kísérleteket (edzés és fagyasztás) RUMED 1000 típusú, több ciklusban programozható fénytermosztátban folytattuk, ami -20 °C és + 50 °C fok között teszi lehetővé a tesztelést, konstans 4000 lux fényerő mellett. A csíráztatáshoz és előneveléshez Sanyo MLR-351H klímakamrát használtunk, ahol +5 °C és 40 °C fok között szabályozható a hőmérséklet, illetve 1000 és -22 ezer lux között a fényerő. A tervezéskor e műszaki lehetőségeket is szükségszerűen figyelembe kellett vennünk.

A vizsgálatokat hat lépcsőből álló kísérletsorozatban hajtottuk végre, 2007 őszétől 2009 márciusáig. A tesztekhez az első ciklusban az 'A1' standard „tavaszi” fajtát és a jól ismert 'Kozmosz' „ősz” fajtát hasonlítottuk össze. A magokat minden esetben standard földkeverékbe, 4x4 cm-es cserepekbe vetettük, majd egyeltük, hogy cserepenként 5-6 egyed maradjon a teszteléshez. A növényeket 3-4 lomblevelés állapotig 15/10 °C hőmérsékleten neveltük (ez mintegy 6 hetet vesz igénybe), 14 ezer lux megvilágítás mellett, 12/12 órás nappali/éjszakai ciklusban. Ezután kerültek a hidegkamrába.

Az első vizsgálati szakaszban tisztáztuk a fagyteszt hőmérsékleti tartományát. Megállapítottuk, hogy a mák számára az LT50 érték -2 és -4 °C között várható (1. táblázat). Az alkalmazott időtartamban ezen értékek között várható a legjellemzőbb eltérés a kétféle genotípus között. Az optimális fejlettségi állapotnak -a gyakorlati tapasztalatokhoz igazodóan- a 3-4 leveles nagyság tekinthető.

1. táblázat *Mákfajták fagyűrése klímakamrában, különböző hőmérsékleteken*
(megmaradt egyedek aránya %)

Nagyság	'A1'				'Kozmosz'			
	0 °C	-2 °C	-4 °C	-6 °C	0 °C	-2 °C	-4 °C	-6 °C
	4 nap	3 nap	3 nap	3 nap	4 nap	3 nap	3 nap	3 nap
6-7 leveles	81	79	0	0	91	97	77	0
3-4 leveles	96	10	0	0	71	54	5	0
szikleveles	49	0	0	0	43	4	0	0

A további kísérletekben a kritikus teszhőmérsékletnek a -3 °C-ot állítottuk be.

Az időtartam és a hőmérsékleti program vonatkozásában újabb két kísérleti ciklus során bebizonyosodott, hogy legkedvezőbb a fokozatos lehűtés, és fagypont alatt az 1-1 hőmérsékleti értéken legfeljebb 3 napig való nevelés (2. táblázat). Ebben a szakaszban már több fajtával dolgoztunk, s egyben arra is információt kaptunk, hogy a termesztési gyakorlat részéről „tavaszi” vagy „őszi” fajtáknak nevezett genotípusok a fagytolerancia szempontjából - bár valóban két csoportot alkotnak -, de ezen belül egymástól különbözőek.

2. táblázat *Mákfajták fagyűrése klímakamrában, különböző ideig történő fagyhatás után*
(megmaradt egyedek aránya %)

Fajta	-2 °C		-3 °C*		
	3 nap	6 nap	3 nap	7 nap	9 nap
'Zeno' (őszi)	75	0	43	22	0
'Leila' (őszi)	78	9	37	10	0
'Korona' (tavaszi)	29	0	0	0	0
'Ametiszt' (tavaszi)	70	0	4	0	0

* A 3 napig -2 °C-on való kezelés folytatásaként

A fagyűrés precíz detektálásához elengedhetetlen a megfelelő regenerációs körülmények biztosítása, az életképesség definiálása. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az alkalmazott 10, 15, 18, 24 és 28 °C közül a középső tartomány, a 18°C a legalkalmasabb az életben maradt egyedek arányának biztos és viszonylag gyors meghatározására. Ezen a hőmérsékleten az életképes növények 14 nap alatt kizöldülnek, új levélkezdeményeik jelennek meg. A fagyhatást túl nem élt egyedek ugyanakkor –kiszáradásos tünetekkel- egyértelműen elpusztulnak. Tapasztalataink szerint a fagyhatás után a +2 °C-on történő átmeneti nevelés feleslegesnek bizonyult.

Ennek alapján a kifejlesztett és a továbbiakban alkalmazott program az alábbi:

- 6 hét előnevelés 15/10 °C (nappali/éjszakai) hőmérsékleten, 14 ezer lux (12/12 nappali/éjszakai) megvilágítás mellett, 3-4 lombleveles állapotig,
- Edzés 4 napig +2 °C-on, majd 4 napig 0 °C-on, 4000 lux (12/12 nappali/éjszakai) megvilágítás mellett, 3-4 lombleveles állapotig,
- Fagyhatás 3 napig -2 °C-on, majd 4 napig -3 °C-on, a korábbi fényviszonyok mellett,
- Regeneráció 14 napig + 18 °C-on, 14 ezer lux (12/12 nappali/éjszakai) megvilágítás mellett.

A vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy az egyes ciklusok a fagyűrő egyedek arányára vonatkozóan kismértékben eltérő eredményt adhatnak, de a kidolgozott módszer a kétféle

mák genotípus (ökotípus) elválasztására azonos körülmények között statisztikailag megbízható eredményt produkál.

1.2. A tesztelt fajták és keresztezett utódaik fagyűrése

A vizsgálatokba vont genotípusok tesztelését részben a fent említett kondicionált feltételrendszerben, részben szabadföldön végeztük. A klímakamrában két ciklus során teszteltük a kontroll szülői fajták mellett azok F1 és F2 utódsorát. Az utódnemzedékeket minden reciprok kombinációban két csoportra bontottuk: az alacsony (max. 0,4%) illetve magas (0,8-2,0%) összalkaloidtartalmú szülői egyedek utódait külön tételként vizsgáltuk.

E kísérletekben tehát arra kerestünk választ, hogy a különböző őszi jellegű szülőfajták hogyan örökítik a fagytoleranciát. Hogyan jelentkezik ez a jelleg az F1 illetve F2 utódnemzedékekben, van-e ilyen szempontból különbség az egyes fajták között, továbbá tapasztalható-e anyai hatás vagy alkaloidtartalomhoz való kapcsoltság?

Nyolc, jellemző kombináció tesztelése alapján megállapítottuk, hogy a keresztezett utódok fagyűrését mindkét szülő befolyásolja. Jól mutatja ezt a 3. táblázatban a 'Kozmosz' x 'Medea' és 'Kozmosz' x 'Korona' kombinációk összehasonlítása, melyek közül az utóbbiban a megmaradt egyedek aránya csak mintegy egyharmada az előzőnek. Hasonlóan fontos az anyai partner is, amit mutat pl. a '67' x 'Medea' és a 'Kozmosz' x 'Medea' kombinációk összehasonlítása, ahol a 'Kozmosz' anyja határozottan eredményesebben örökött a fagyűrést. A reciprok kombinációkra vonatkozóan e kísérletsorból a 'Minoán' x 'Kozmosz' és 'Kozmosz' x 'Minoán' adatsor azt tükrözi, hogy az anyai hatás az F1 nemzedékben még jelentkezik, később azonban nem jelentős.

Az első hibridnemzedékben az utódpopulációk döntő része az őszi kontroll fajták értékeihez viszonyítható megmaradást mutatott, ami a jelleg dominanciájára utal. E dominancia azonban heterózis jellegű, mivel a következő nemzedékben a fagyűrés erőteljesen, átlagosan mintegy negyedére csökkent, ami a tavaszi szülőfajták értékkategóriájához sorolható. Jelentősebb megmaradási értékeket csak a 'Kozmosz' x 'Medea' kombinációban kaptunk. Az F2 nemzedékek adatai alapján úgy tűnik, hogy az alkaloidtartalom nincs közvetlen összefüggésben a hidegtűréssel: egyes esetekben a magasabb, máskor pedig az alacsonyabb alkaloidtartalmú egyedek utódainak fagyűrése volt jobb.

3. táblázat Keresztezett utódnemzedékek fagyűrése klímakamrás tesztek alapján
(megmaradt egyedek átlagos aránya, %)

Kombináció	F1	F2 átlag	F2 (magas)	F2 (alacsony)
Minoán x Kozmosz	15	7	5	8
Kozmosz x Minoán	27	9	6	11
Kozmosz x Medea	33	18	21	15
'67' x Medea	23	3	0	5
'67' x Korona	25	0	0	0
Kozmosz x Korona	10	9	8	10
Leila x Ametiszt	35	3	10	6
Leila x '1/172'	42	3	6	0
Átlag	26,2	6,5	7,0	6,9
Őszi szülőfajták	22-40			
Tavaszi szülőfajták	0-10			

A szabadföldi fagyűrés vizsgálatok az F2 nemzedék esetében kerültek beállításra, mivel az F1 nemzedékben a rendelkezésre álló maganyag mennyisége csak a tavaszi vetést tette biztonsággal lehetővé.

A vetés 2008 szeptember végén történt, három ismétlésben, 4 m²-es parcellákba. A tél beállta előtt, december elején, parcellánként felmért állománysűrűséget (tőszám) hasonlítottuk össze a tavaszi tőállománnyal (március végén). Eredményeink megerősítették a klímakamrában tapasztaltakat (4. táblázat). Eszerint a gyakorlatban őszi illetve tavaszi fajtaként ismert anyagok e csoportokon belül sem azonos fagyűrőképességgel rendelkeznek, s ezt utódaikba is különböző mértékben örökítik. Ez utóbbi szempontból a tavaszi ciklusú fajták közül kiemelhető a 'Medea', mint a hidegtűrést eredményesen örökítő partner, az ellentétes oldalról pedig a 'Korona', mely a legtöbb kombinációban az átlagnál gyengébb eredményt produkált. Az őszi ciklusú anyagok közül a klímakamrában szerzett tapasztalatokhoz hasonlóan a 'Kozmosz' bizonyult eredményesebbnek a '67' törzsnél. Reciprok kombinációk között nem állapítható meg egyértelmű előny azok javára, ahol az anya az őszi ciklusú partner.

A szabadföldi parcellákon az F2 nemzedék átlagos fagyűrése –bár jelentős szórással- de a tavaszi, fagyérzékeny szülőkéhez hasonló nagyságrendű. Egyes fajokban (pl. árpa, *Arabidopsis*) szintén leírták a fagytolerancia heterózisos jellegét, ami az F2 és további nemzedékekben csökkent (Przulj et al., 1997; Rohde et al., 2004).

4. táblázat *Keresztezett F2 udódnemzedékek fagyűrése szabadföldön (2008-2009)*
(megmaradt egyedek átlagos aránya, %)

Kombináció	F2
Minoán x Kozmosz	3
Kozmosz x Minoán	21
* '67' x Minoán	4
Kozmosz x Medea	17
Medea x Kozmosz	12
'67' x Medea	15
Medea x '67'	5
Kozmosz x Korona	8
Korona x Kozmosz	11
'67' x Korona	2
Korona x '67'	3
Leila x Ametiszt	13
Ametiszt x Leila	6
Leila x '1/172'	0
'1/172' x Leila	2
* Przemko x Kozmosz	19
* Przemko x Leila	2
Átlag	8,4
Szórás	6,7
Őszi szülőfajták	35-50
Tavaszi szülőfajták	0-8

A bemutatott eredmények a más esetében teljesen új megállapítások, mivel a fagyűrésre vonatkozó korábbi tapasztalatok empirikus, eseti, és alig dokumentált adatok.

Adataink tehát elsősorban dominancia hatások jelenlétére utalnak, de reprodukálható hasadási arányok pontos megállapításához további részletes vizsgálatok szükségesek. Monogénes vagy kétlokuszos meghatározottság nem látszik valószínűnek.

A szakirodalmi adatok még a legjobban feltárt őszi búza esetében is gyakran ellentmondásosak, egyazon kísérletben is beszámolnak additív és dominancia hatások jelenlétéről is (pl. Petrova et al., 1977), sőt a genetikai háttér hőmérséklet függéséről is, amennyiben igen alacsony hőmérsékleten megváltoznak a dominancia viszonyok (Veisz, 1997). Mindez magyarázható azzal, hogy a fagyűrész biokémiai-élettani háttere genotípustól is függ és többféle mechanizmust foglal magában (Stone et al., 1993; Wisniewski et al., 1997). Éppen ezért ma a szakirodalmak többsége a hidegtűrést - más stressztűréshez hasonlóan-, QTL szabályozás alatt álló, poligénes tulajdonságnak tartja.

1.3.A fagyűrész biokémiai markerei

Ismert, hogy a szakirodalomban számos biokémiai marker szerepel, mint a fagytoleranciával közvetlenül vagy közvetetten összefüggésben álló molekulák. Ilyenek az ozmoprotektáns vegyületek a kismolekulájú oldható cukrok, a telítetlen zsírsavak, speciális aminosavak illetve krioprotektív fehérjék (Kacperska-Palacz, 1978; Palva et al., 2001 stb.). Jelentős szerepe van a fagyhatások kivédésében a különböző antioxidáns vegyületeknek (pl. Hare et al., 1998, stb.), az adaptációt elősegítő szignálmolekuláknak (pl. ABA, kinázok, foszfatázok, Ca^{++} ionok) továbbá a génexpressziót közvetlenül befolyásoló transzkripció faktoroknak (Leung és Giraudat, 1998; Nakashima és Yamaguchi-Shinozaki, 2006, Thomashow, 1999; Vágújfalvi et al., 2005 stb.).

Bár e biokémiai marker- és szignálmolekulák vizsgálata nem képezte munkatervünk szerves részét, indokoltnak látszott megvizsgálni ilyen oldalról is az alapvető eltéréseket a két ökotípusú mátaxonok között.

Munkánk során a prolin és az oldható cukorfrakció felhalmozódására vonatkozóan kívántunk információt gyűjteni. Ehhez minden alkalommal az ismert és standard fajtákat vontuk kísérletbe.

Prolintartalom

Öt klímakamrás és egy szabadföldi kísérlet során teszteltük ismert mákfajták prolintartalmát és annak változását hidegindukció hatására. A kísérletek 2007 márciusa és 2009 áprilisa közt folytak.

Az első szakaszban három kísérleti ciklus során a standard 'A1' tavaszi és a hagyományos 'Kozmosz' őszi fajtákat hasonlítottuk össze. A növényeket az 1.1. részben ismertetett környezeti feltételrendszerben neveltük, ahol az edzést 4 leveles fejlődési fázisban, először +2 majd 0 °C-on folytattuk, s ezután a hőmérsékletet fokozatosan tovább csökkentettük. A prolintartalmat Bates (1973) módszere szerint, mintánként 5 ismételtsben, spektrofotometriásan határoztuk meg.

Adataink szerint a hideghatás nélkül, 15/10 °C-on való nevelés során az őszi és a tavaszi ökotípusok prolin szintje között nem tapasztalható szignifikáns eltérés. Az 'A1' fajta 18,16-48,96 a 'Kozmosz' 16,73-36,52 µg prolint tartalmazott 1 friss növényanyagra vonatkoztatva. Az edzés során kismértékű növekedés figyelhető meg mindkét fajtában: a tavaszi fajta 1,7-2,1 szeresére, az őszi fajta 1,5-2,3 szorosára növeli a felhalmozódási szintet. Ebben a fázisban szintén nem mérhető statisztikailag igazolható különbség közöttük. Jelentős változást tapasztaltunk azonban a fagyponthoz, már 3 nap -2 °C-on való nevelést követően: a tavaszi ('A1') fajta prolintartalma 80,98 míg az őszi ('Kozmosz') fajta értéke 166,46 µg/g-ra emelkedett. Ez utóbbi kilencszeres növekedés a kiindulási szinthez képest.

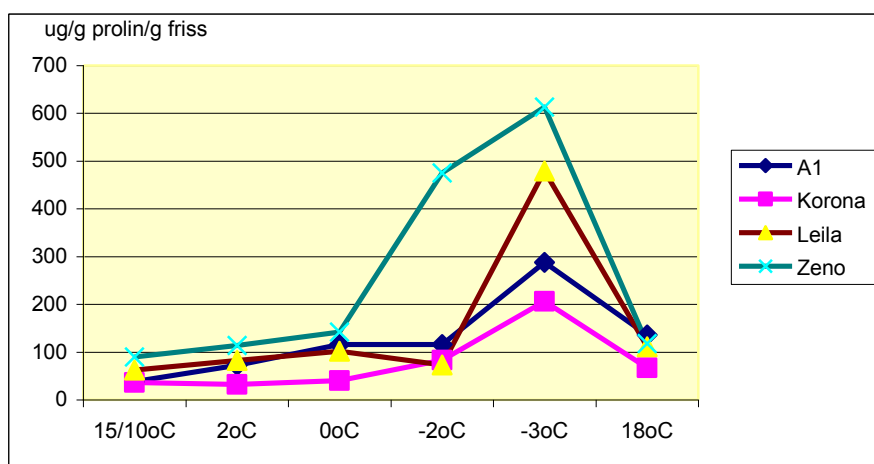
Ezt követően további, hazánkban termesztésben álló fajtákat vontunk a kísérletbe, hogy megvizsgáljuk a fenti reakciók univerzális jellegét. Hat fajta edzés előtti és 10 napos edzést követő prolintartalmi értékeit mutatjuk be az 5. táblázatban.

5. táblázat *Tavaszi és őszi mákfajták prolintartalmának változása ($\mu\text{g/g}$) 6 nap $+2^\circ\text{C}$ és 4 nap 0°C -on való hidegedzés hatására*

Fajta	Edzés előtt	Edzés után
Kozmosz	22,03	49,57
Zeno	102,41	243,58
Leila	126,68	217,67
<i>Átlag (ősziek)</i>	83,63	170,34
A1	27,13	145,66
Óriás kék	-	175,64
Ametiszt	136,68	125,05
<i>Átlag (tavasziak)</i>	82,01	148,72
Összátlag	82,82	159,53

Mindezen ismeretek tükrében érdemesnek látszott megvizsgálni azt is, hogy milyen dinamikát követ a prolintartalom fent tárgyalt emelkedése. Ennek érdekében a fagyteszt klímaprogramunk során rendszeres mintavétellel követtük nyomon két őszi (Zeno, Leila) és két tavaszi (A1, Korona) fajta viselkedését (2008 augusztus). Eredményeink kiegészítették és megerősítették a korábban tapasztaltakat (1. ábra).

A prolinszint emelkedése már 0°C -on enyhén megindul, de erőteljes akkumuláció -2°C -on való edzés során következik be. A fagyűrő és a fagyérzékeny fajták kiindulási koncentrációjában nem tapasztalható lényeges eltérés, de az edzés során az előbbieket lényegesen magasabb értéket tudnak elérni. A regeneráción átesett, megmaradt egyedek prolinszintje ismét csaknem a hideghatás előtti szintre csökken minden fajtában.



1. ábra *A prolín akkumulációjának dinamikája a hőmérséklet függvényében klímasekrényben nevelt fagytoleráns és fagyérzékeny mákfajtákban*

A prolín akkumulációt szabadföldön is igazolni tudtuk. 2008-2009 telén kisparcellás kísérletben teszteltük a következő hat hazai fajtát. Tavasziak: A1 (magas morfinos), Korona (magas narkotinos) és Ametiszt (alacsony hatóanyagú, étkezési fajta); ősziak: Kozmosz

(közepes alkaloidtartalmú), Leila és Zeno (alacsony alkaloidtartalmú) fajták. Az őszi vetés az 1.2. pontban tárgyalt körülmények között történt, s a mintavételt a teljes növényből, november közepén (a növényeket fagy még nem érte), november végén (7 napig fagyponthoz közel a napi középhőmérsékletek), valamint április elején (regenerálódott, megindult növények) végeztük. A klímakamrás eredményekhez hasonlóan, az edzés előtt nem tapasztaltunk lényeges eltérést a fajták prolintartalmában (6. táblázat). Az edzésre alkalmas napok után a prolin koncentrációja igen nagy mértékben megnőtt (fajtától függően akár 20-30 szorosra), majd a tavaszra megmaradt növényekben ismét lecsökkent a kiindulásihoz közeli értékre. Míg e tendencia minden anyagban azonos, az egyes értékek erősen különbözőek, és nem köthetők szorosan a fagyűrészhez. A klímakamrás adatokhoz képest esetenként lényegesen magasabb értékeket kaptunk, aminek magyarázata lehet, hogy a mák az igen enyhe október-novemberi időszakban intenzíven növekedett, és a korábbi tesztekhez képest fejlettebb, nagyobb növényeket tudtunk mintázni. Feltehető tehát, hogy a növény fejlettsége is befolyásolja a prolin akkumulációt, de ennek részletes vizsgálata már meghaladta munkánk kereteit.

6. táblázat *Különböző mákfajták prolintartalma (µg/g) szabadföldön (2008-2009 telén)*

Fajta	Fagyhatás előtt (nov. közepe)	Edzés után (nov. vége)	Regenerálódás után (ápr. eleje)
Kozmosz	53,97	1129,29	46,19
Zeno	95,93	225,95	106,24
Leila	62,85	674,28	126,73
<i>Átlag (ősziek)</i>	<i>70,92</i>	<i>676,51</i>	<i>93,05</i>
A1	90,95	433,77	-
Korona	61,84	1632,72	-
Ametiszt	49,67	538,35	-
<i>Átlag (tavasziak)</i>	<i>67,49</i>	<i>868,28</i>	-
Összátlag	69,21		-

Összefoglalóan megállapítottuk, hogy tölevélrózsás (3-6 leveles) állapotban a prolin a hazai nemesített mákfajtákban kimutatható, de a fagyűrő, a gyakorlatban őszinek nevezett fajták és a fagyérzékeny, „tavaszi” fajták különbsége hidegindukció nélkül nem bizonyítható. Hidegedzés hatására (2°C, de különösen fagyponthoz közel) a prolinszint minden fajtában jelentősen –akár 30 szorosra– megemelkedik. Megállapítható, hogy a fagyűrő fajtacsoporton belül is lényeges eltérések jelentkeznek a prolin felhalmozódásban. Valószínű tehát, hogy a prolin anyagcsere intenzitásának szerepe van –sok más fajhoz hasonlóan (Hare et al., 1998) – a mák fagyűrésében is, de nem ez az egyedüli és közvetlenül felelős tényező.

Oldható cukrok felhalmozódása

A kis molekulájú szacharidok, mint ozmótikumok felhalmozódását egy előkísérletet követően klímakamrában nevelt növényeken tanulmányoztuk. Az 5. táblázatban jelzett fajtákat, a fentebb bemutatott feltételrendszerben neveltük, és 10 nap edzés után mért cukortartalmukat összehasonlítottuk az edzés előtti értékekkel. Hatféle szacharidvegyületet (glükóz, galaktóz, fruktóz, mannitol, szacharóz, raffinóz) azonosítottunk és mértünk standardokhoz viszonyítva, HPLC műszeres analízissel.

Eredményeink alapján egyértelműen megmutatkozik, hogy a szacharid-komponensek spektruma hidegedzés hatására valamennyi mákfajtában erőteljesen átalakul (6/a és 6/b táblázat). Kiemelkedően megnő a glükóz és a fruktóz felhalmozódása, melyek sok esetben jelentkeztek más fajokban is ozmótikus stressz következményeként (Gusta et al., 2004; Klotke

et al., 2004). E vegyületek aránya a kiindulási értéknek mintegy négyszeresére nő. Ezzel egyidejűleg gyakorlatilag eltűnik a galaktóz, a mannitol és a szacharóz, ami legalábbis az utóbbi esetben összefügghet az említett monoszacharidok felhalmozódásával. Az összes cukortartalom az edzés után mintegy 3 és félszeresére emelkedik. Jellemző viszont, hogy sem a kiindulási, sem a megemelkedett cukortartalom alapján nem állapítható meg szignifikáns eltérés a tavaszi illetve őszi ökotípusú mákfajták között. Bár a tavasziak átlagértékei kismértékben az ősziak alá esnek, az egyes fajták értékei közt nagy a szórás. Megállapítható tehát, hogy a prolinhoz hasonlóan az oldható cukrok koncentrációja az edzés hatására a mákban jelentősen megnő, de ennek közvetlen összefüggése az egyes taxonok fagytűrésével nem mutatható ki, tehát feltehetően a fagytűrésnek legfeljebb egyik faktora lehet.

6/a. táblázat *Tavaszi és őszi mákfajták oldható cukortartalma hideghatás előtt*

Fajta	glükóz	galaktóz	fruktóz	mannitol	szacharóz	raffinóz	Összes
Kozmosz	4,22	0,55	5,11	0,14	1,63	0,84	12,49
Zeno	3,97	0,21	4,60	0,00	0,73	0,96	10,47
Leila	4,42	0,31	5,51	0,07	0,84	0,65	11,80
<i>Átlag</i>	<i>4,20</i>	<i>0,36</i>	<i>5,07</i>	<i>0,07</i>	<i>1,07</i>	<i>0,82</i>	<i>11,59</i>
A1	5,46	0,36	6,44	0,15	1,08	0,97	14,46
Óriás kék	2,97	0,18	3,24	0,05	0,73	0,56	7,73
Ametiszt	3,57	0,27	4,20	0,09	0,80	1,09	10,02
<i>Átlag</i>	<i>4,00</i>	<i>0,27</i>	<i>4,63</i>	<i>0,10</i>	<i>0,87</i>	<i>0,87</i>	<i>10,74</i>
Összátlag	4,10	0,32	4,85	0,09	0,97	0,85	11,16

6/b. táblázat *Tavaszi és őszi mákfajták oldható cukortartalma (mg/g) 6 nap +2 °C és 4 nap 0 °C-on való hidegedzés után*

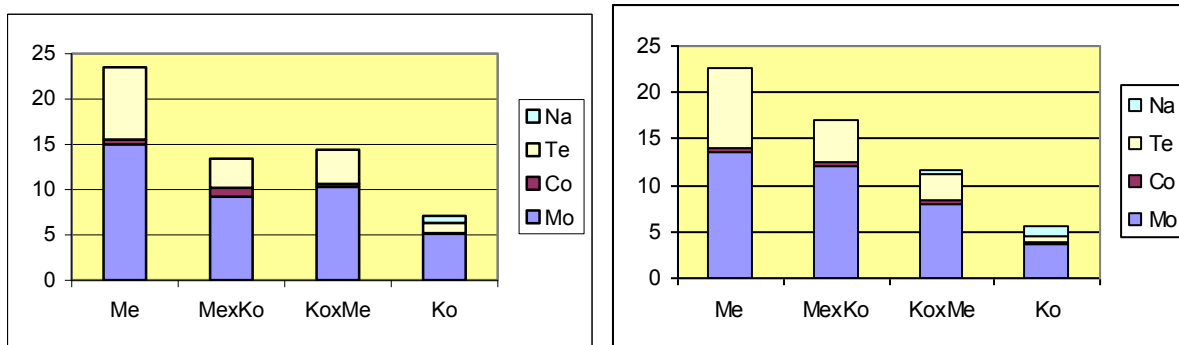
Fajta	glükóz	galaktóz	fruktóz	mannitol	szacharóz	raffinóz	Összes
Kozmosz	18,90	0	19,67	0	0,05	1,05	39,67
Zeno	17,40	0	17,18	0	0	1,11	35,69
Leila	16,75	0	17,77	0	1,18	1,08	36,78
<i>Átlag</i>	<i>17,68</i>		<i>18,21</i>		<i>0,74</i>	<i>1,08</i>	<i>37,38</i>
A1	18,27	0	19,14	0	0	1,09	38,50
Óriás kék	19,50	0	19,85	0	0	1,13	40,48
Ametiszt	11,78	0	11,29	0	0	0,98	24,05
<i>Átlag</i>	<i>16,52</i>		<i>16,76</i>			<i>1,06</i>	<i>34,34</i>
Összátlag	17,10	0	17,49	0	0,37	1,07	35,86

2. Az alkaloidtartalom jellegzetességei

2.1. Az alkaloidtartalom variabilitása a keresztezett utódnemzedékekben

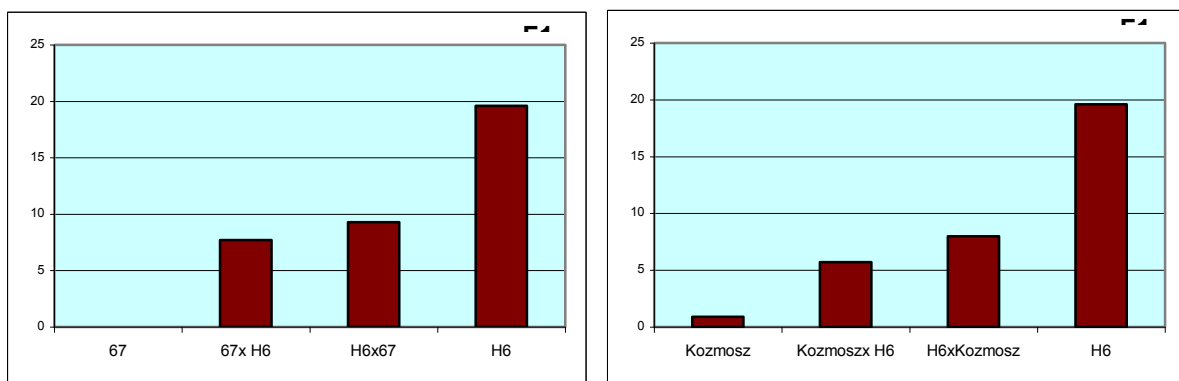
A hibridek alkaloidtartalma

A legtöbb kombinációban a reciprok F1 utódsorok átlaga köztes szintet mutatott mind az összalkaloid, mind a morfintartalom szempontjából (2.ábra). Enyhe overdominanciát tapasztaltunk a Mi x 67 kombinációban.



2.ábra 'Medea' x 'Kozmosz' keresztezések F1 (balra) és F2 (jobbra) reciprok utódnemzedékeinek alkaloidtartalma a szülői fajták mellett

A hibridek tebaintartalma csaknem minden kombinációban köztes értéket mutatott, és a 6-ból négy kombinációban anyai hatás is tapasztalható. A kodein esetében legtöbbször overdominanciát regisztráltunk. Narkotin tekintetében az utódok átlagos felhalmozási szintje a köztesnél kevesebb, és megfigyelhető az anyai hatás (3.ábra).



3.ábra A narkotintartalom a 'Korona' fajta reciprok F1 utódaiban a '67' törzs és a 'Kozmosz' fajta kombinációiban

A magas hatóanyagú fajták F2 utódaiban az összes alkaloidtartalom valamint morfin- és tebaintartalom tekintetében szintén intermedier értékeket kaptunk (2.ábra). A Minoán fajta kombinációiban viszont az átlag a magasabb szülőéhez közelít. A kodein overdominanciája valamint a narkotin köztesnél alacsonyabb szintje is a legtöbb kombinációban megmaradt. E komponensekre vonatkozóan a szakirodalom mindezideig hiányos és nem egységes (Bernáth-Németh, 2010), így adataink hozzájárulnak a mechanizmus tisztázásához.

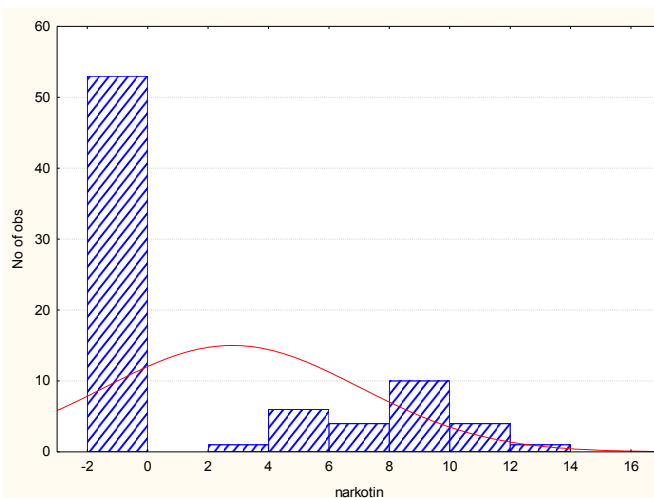
A reciprok kombinációkat páronként összehasonlítva az F2 összes alkaloidtartalmában sehol nem tapasztaltunk lényeges eltérést egymástól (6. ábra és 7. táblázat). Az egyes alkaloid komponenseket tekintve azonban a fentebb leírtaknak megfelelően megjelentek bizonyos anyai hatások, elsősorban a tebaín és a narkotin esetében.

7.táblázat *A t próba eredményei néhány jellemző reciprok kombináció F2 utódsorainak összes alkaloidtartalmára*

Kombináció	Átlag (‰)	t érték	Szign. szint (p)
67 x H6	17,03	1,063	0,292
H6 x 67	14,15		
Me x 67	17,94	0,799	0,428
67 x Me	16,31		
Me x Ko	12,56	0,330	0,741
Ko x Me	11,79		
Ametiszt x Leila	4,63	0,524	0,600
Leila x Ametiszt	4,26		

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a mákalkaloidok felhalmozódását elsősorban additív génhatások befolyásolják, amit a gyakorlatban a számos, egyedszelekcióval előállított kiváló fajta is alátámaszt. A poligénus meghatározottság miatt a célzott géntechnológiai beavatkozások eredményessége is elmaradt egyelőre a várttól (Allen et al., 2004), a termelésben pedig igen jelentős környezeti-évjáratok függésben mutatkozik meg.

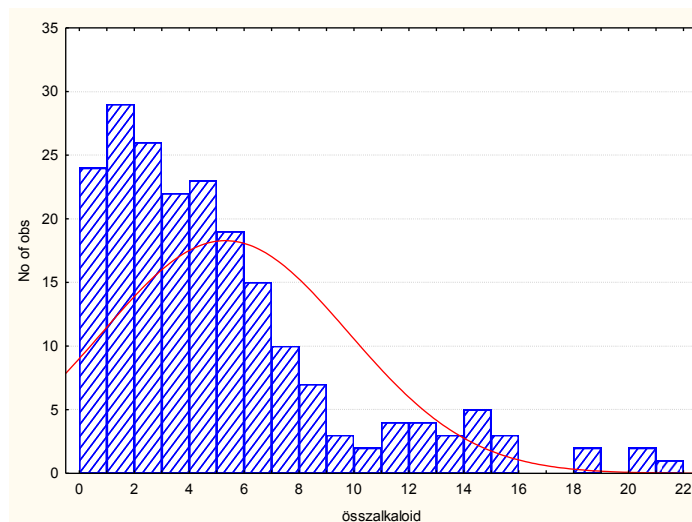
Kissé összetettebb a helyzet a narkotin esetében, ahol a felhalmozódáshoz a genetikai háttérnek biztosítani kell a bioszintézis ftalidizokinolinok irányába történő elágazását. A legtöbb hazai fajtában a narkotin nem, vagy legfeljebb nyomnyi mennyiségben jelenik meg. A vizsgált genotípusok között csupán a 'Korona' fajta hordozta azokat az alléleket, ami ezt lehetővé teszi, amit jól tükröz a magas hatóanyag kombinációk F1 utódainak jellegzetesen 2 csoportot adó eloszlása (4.ábra).



4.ábra *A narkotintartalom eloszlása a magas hatóanyag kombinációk F1 utódnemzedékében*

Az alacsony hatóanyagú genotípusok kombinációiban az alacsony hatóanyagtartalom az F1 utódsorokban elenyésző számban (1,9%), és csak a kombinációk felében jelent meg. Az F2 utódsorokban azonban minden kombinációban kihasadtak nagyon alacsony hatóanyagtartalmú (<1‰) utódok is, arányuk átlagosan 7,8%. Megállapítható, hogy a nyomnyi és az igen alacsony alkaloidszintű egyedek –várakozásunktól eltérően- nem alkotnak élesen elváló, külön csoportot (5.ábra).

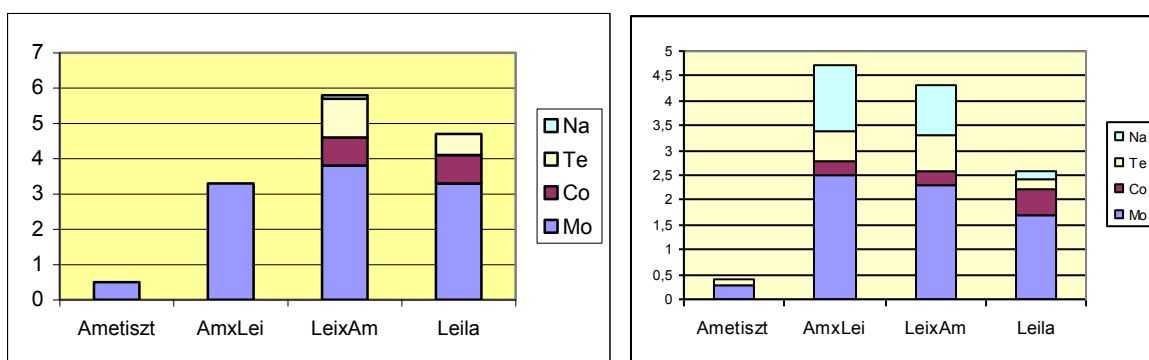
Anyai hatás a tanulmányozott esetek közül az 'Ametiszt'x'Leila' kombináció F1 nemzedékében jelentkezett, főleg a morfin melletti többi alkaloid tekintetében (6.ábra).



5.ábra Az alacsony hatóanyagtartalmú fajták F2 utódnemzedékeinek összalkaloidtartalom szerinti eloszlása

Az átlagos össz-alkaloidszint mind az F1 mind az F2 nemzedékben, overdominanciát mutatott a szülői átlaghoz képest, sőt egyes esetekben heterózis jellegű (6.ábra). A fő alkaloid, a morfin mellett az F2-ben megemelkedett a tebain, a kodein és a narkotin aránya csaknem minden kombinációban az első utódnemzedékhez képest. Korábbi, éppen az 'Ametiszt' fajta előállítását megelőző kísérleteinkben szintén azt tapasztaltuk, hogy az F1 alkaloidtartalma jelentősen felülmúlta a szülői átlagot, kivéve, amikor mindkét partner kifejezetten nyomnyi mennyiséget felhalmozó fajta volt (Németh et al., 2002).

A nagyon alacsony alkaloidszint az 'Ametiszt', 'Przemko' fajtákban és az 1/172 sz. törzsben tehát recesszív bélyegnek bizonyult. Ezek a tapasztalatok magyarázhatók a már ismert ténnyel, hogy az alkaloidok nyomnyinál nagyobb koncentrációban történő felhalmozásáért a TYDC/DODC géncsalád felelős, míg a konkrét mennyiség és spektrum ezek után, több lépésen keresztül alakul ki (Bernáth és Németh, 2010). Ez utóbbira alapvetően az említett poligénus determináció jellemző. Ebből következően a stabilan „alkaloidmentes” genotípusok is képesek már 1-2 nemzedéken belül akár kiemelkedően magas szintű akkumulációt örökíteni, ha a kezdeti lépést determináló lokuszba domináns allél kerül. Ugyanakkor a TYDC/DODC szinten domináns alléllal rendelkező egyedek fenotípusa is lehet igen alacsony alkaloidprodukción, de ennek rögzítése a további utódokban nyilván sokkal lassabb.



6.ábra Az 'Ametiszt' x 'Leila' kombináció F1 és F2 utódainak átlagos alkaloidtartalma a szülők mellett

Az egymást követő nemzedékek variabilitása:

A fentiekkel összhangban, a tanulmányozott F1 és F2 nemzedékek egyedeinek variabilitása kombináción belül egymáshoz igen hasonló (8.táblázat). Transzgresszív hibridek alig jelennek meg. Ez alól kivétel a nullvariánsok (nyomnyi alkaloidtartalommal) megjelenése az F2-ben, ami alapvetően az alacsony alkaloidtartalmú anyagok utódnemzedékeiben okoz csökkenést az átlag és a minimum értékekben. A magas hatóanyagtartalmú kombinációkban nullvariánsok csak a kombinációk kétharmadában jelentek meg, átlagosan 2%-ban. Ez arra utal, hogy ezen szülőfajtákban előfordul heterozigóta genotípus is a TYDC/DODC regulációs gének szintjén, de pontosabb következtetések levonására ezen utódegyedek további hasadásának vizsgálata szükséges. A magas hatóanyag irányában szegregálódó transzgresszív jellegű csoport az F2-ben csupán a narkotint tartalmazó utódsorokban jelent meg: egy, -az összesnek csupán 2%-át alkotó-, nagyon magas narkotin felhalmozású egyedek frakciója. Ez a narkotin szint azonban kísérletünkben nem haladta meg a magasabb hatóanyagú szülő, a 'Korona' szintjét.

8.táblázat Az F1 és az F2 generáció egyedi hatóanyagtartalmának variabilitása néhány jellemző keresztezési kombinációban (morfin ‰)

Kombináció	átlag	minimum	maximum	szórás
Kozmosz x Minoán F1	9,6	1	20	4,64
F2	7,4	0	18	3,86
67 x Medea F1	10,8	1	16	5,37
F2	8,7	0	15	4,76
Korona x 67 F1	7,6	2	16	3,11
F2	7,1	1,5	12	2,73
Korona x Kozmosz F1	4,8	1	12	2,35
F2	5,3	0,5	15	2,85
Przemko x Leila F1	5,2	2	10	2,46
F2	3,1	0	10	3,35
Leila x Ametiszt F1	3,8	2	7	1,27
F2	2,3	0	8	2,01
Przemko x Kozmosz F1	5,6	1	8	1,65
F2	3,1	0	13	2,71

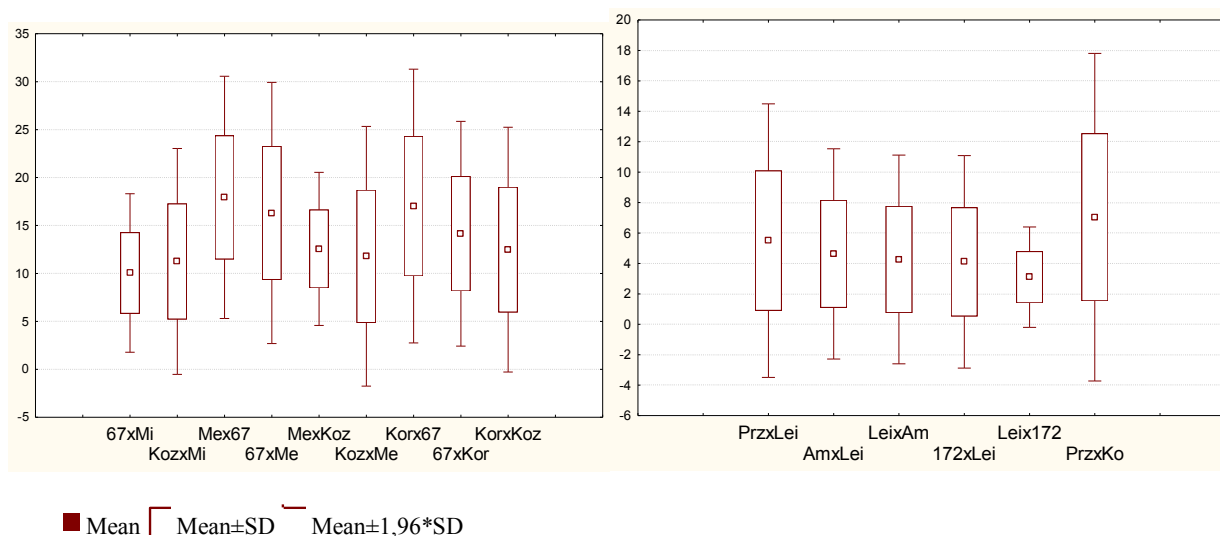
Az F1 szülői egyedek és F2 utódaik alkaloidszintjének összefüggésére a magas hatóanyag kombinációkban jellemző, hogy legerősebb a korreláció a narkotin esetében ($r=0,840$ $p=0,0000$), de szignifikáns a morfinra ($r=0,545$ $p=0,0000$) és a tebainra is ($r=0,390$ $p=0,0006$). Ugyanezek az összefüggések az alacsony hatóanyagú genotípusok kombinációiban – valószínűleg a DOPA szintjén bekövetkező F2 szegregáció miatt - nem szignifikánsak, kivéve a narkotint, ahol a fent említettek alapján erős meghatározottság érvényesül.

Az egyes kombinációk eltérései

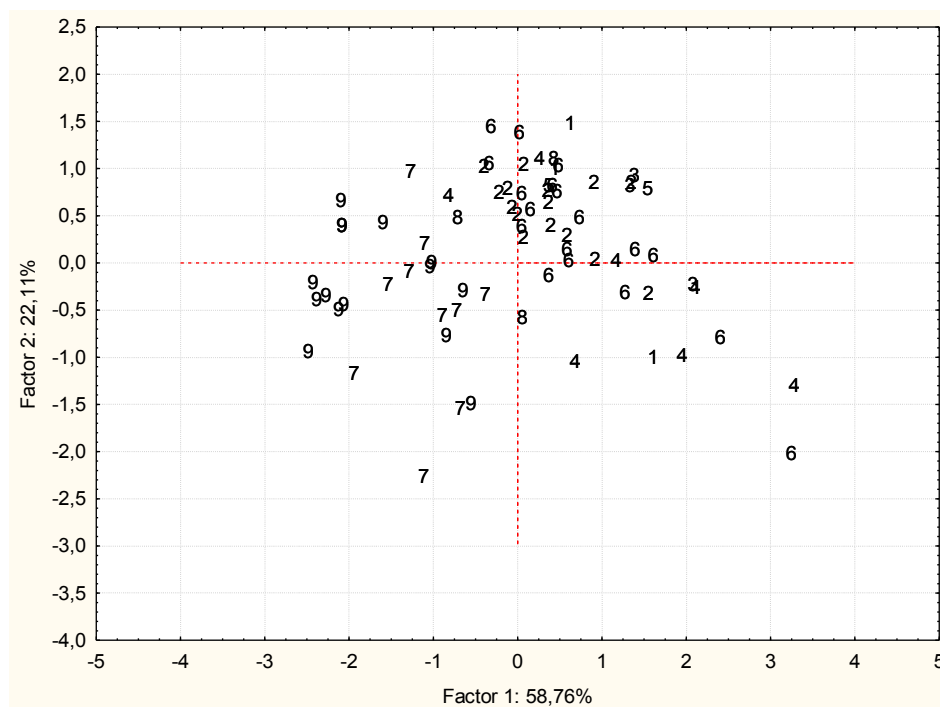
Az alkaloid felhalmozódási jellemzők fentebb leírt általános jellemzői és számos hasonlósága mellett is, a magas hatóanyagtartalmú szülői kombinációk utódsorai a konkrét értékek alapján szignifikánsan ($p=0,000$) különböznek egymástól, mind az F1-ben, mind az F2-ben (7 és 8. ábra). Azonos anyafajták esetében is tapasztalható eltérés a különböző pollenadó partnerrel végzett keresztezések utódai között. A 'Korona' x '67' kombinációban például az átlagos alkaloid felhalmozódás 3-4 ‰-el magasabb, mint a 'Korona' x 'Kozmosz' nemzedékekben (F1, F2), annak ellenére, hogy a '67' nem tartalmaz narkotint.

Az alacsony hatóanyagtartalmú szülők keresztezett utódnemzedékeiben nem mutatható ki szignifikáns különbség az F2 kombinációk között (7. ábra). A pollenadó hatása azonban itt is megnyilvánul: a 'Przemko' x 'Leila' kombinációban az egyedek döntően morfin túlsúlyosak,

míg a 'Przemko' x 'Kozmosz' utódokban a morfin aránya az összes alkaloidtartalomban átlagosan mintegy 50-60%.



7.ábra *A magas (balra) és az alacsony (jobbra) hatóanyagú genotípusok F2 utódsorainak átlaga és szórása reciprok kombinációnként*



8. ábra *A magas hatóanyagtartalmú kombinációk elhelyezkedése a főkomponens analízis koordináta-rendszerében*

1	67x Mi	3	Mex 67	5	Mex Ko	7	H6x 67	9	H6x Ko
2	Kox Mi	4	67x Me	6	Kox Me	8	67x H6		

A testvértörzsek eltérései:

Egy-egy keresztezési kombináción belül a törzsek közötti különbségek változóan alakultak, mind az F1 mind az F2 nemzedékben. A magas hatóanyagtartalmú szülők utódsoraiban

legalább $p=0,095$ szignifikancia szinten eltérő volt a törzsek összes alkaloidtartalma a 9 közül 5 kombinációban. Az alacsony hatóanyagos keresztezések F2 törzsei kombinációkon belül nem mutatnak szignifikáns eltérést egymáshoz képest az összalkaloid tekintetében, bár F1-ben még a kombinációk felében ezt tapasztaltuk. Ennek oka az is lehet, hogy a F2 minden esetben jelentős törzsen belüli szórással rendelkezik.

Az alkaloidok korrelációs rendszere:

A munka folyamán elvégzett többezer hatóanyagvizsgálat alapján számításokat végeztünk a fő alkaloidok egymás közötti korrelációs rendszerére. Az adatok szerint a morfinánok (morfin, kodein, tebain) egymással szignifikáns, pozitív kapcsolatban állnak. A morfinánok és a narkotin között az összefüggés a legtöbb esetben negatív, és ritkábban szignifikáns. A narkotint fő alkaloidként felhalmozó utódok populációiban azonban a narkotin-morfin összefüggés erős és pozitív (pl. $r=0,50^*$ 'Korona' x 'Kozmosz' illetve $r=0,54^*$ 'Korona' x '67' F1). Ennek háttere lehet a retikulin előtti bioszintetikus szakasz igen erős prekursor áramlást biztosító genetikai berendezkedése, továbbá alátámasztja azt, hogy a más alkaloidok bioszintézise rendkívül összetett enzimátikus szabályozás alatt (Facchini et al., 2007).

9. táblázat A négy fő mákalkaloid korrelációja (r) a különböző utódpopulációkban végzett számítások alapján

	Kodein	Tebain	Narkotin
Morfin	0,37* alacsonyok F1 0,21 magas F1 0,26* magas F2 0,41* alacsony F2	0,43* alacsonyok F1 0,59* magas F1 0,29* magas F2 0,44* alacsony F2	-0,40* magas F1 -0,16* magas F2 -0,01 alacsony F2
Kodein		0,61* alacsonyok F1 0,49* alacsony F2 0,54* magas F1 0,47 magas F2	-0,15 magas F1 -0,00 magas F2 0,15* alacsony F2
Tebain			-0,53 magas F1 -0,13* magas F2 -0,04 alacsony F2

2.2. Az alkaloidtartalom és a téltűrés összefüggései

A klímakamrás tesztek során azt tapasztaltuk, hogy egy kombináción belül a magas illetve az alacsony alkaloidtartalmú részpopuláció utódai között nincs egyértelmű különbség a fagyatűrés tekintetében (ld. 3. táblázat). Ezt a kérdést a szabadföldi áttelelő populációkban nyílt módunk növényegyedek szinten is tanulmányozni. A téli tömegmaradás és a megmaradt egyedek alkaloidtartalma közötti összefüggés elméletileg a fagyatűrés és a hatóanyag felhalmozódás valamilyen szintű kapcsoltságát jelezheti. Ezért megvizsgáltuk, hogy a kísérleti F2 hibridpopulációk szabadföldi téli tömegmaradása (ld. 1.2. rész) és az azokból felnövő egyedek átlagos alkaloidtartalma között igazolható-e kapcsolat. A korreláció gyenge és nem szignifikánsnak bizonyult ($r=0,15$), tehát a feltételezett összefüggés nem volt bizonyítható (10. táblázat).

10. táblázat A szabadföldi F2 populáció fagytürése és átlagos alkaloidtartalma

Kombináció	F2 megmaradás (%)	Alkaloid összes (‰)
Minoán x Kozmosz	3	
Kozmosz x Minoán	21	11,26
'67' x Minoán	4	10,05
Kozmosz x Medea	17	11,79
Medea x Kozmosz	12	12,57
'67' x Medea	15	16,31
Medea x '67'	5	17,93
Kozmosz x Korona	8	
Korona x Kozmosz	11	12,49
'67' x Korona	2	14,15
Korona x '67'	3	17,03
Leila x Ametiszt	13	4,26
Ametiszt x Leila	6	4,63
Leila x '1/172'	0	3,10
'1/172' x Leila	2	4,11
Przemko x Kozmosz	19	7,04
Przemko x Leila	2	5,50

A téltűrés és az alkaloidtartalom összefüggésének feltárásához összehasonlítottuk ugyanazon kombinációban az F2 nemzedék őszi vetésű valamint tavaszi vetésű populációinak hatóanyagtartalmát is. A két populáció vetéskor genetikailag azonos volt, az őszi vetésből azonban csak az áttelelt egyedek kerülhettek a mintába.

Megállapítottuk, hogy a fagy által szelektált részpopuláció valamint a teljes F2 összes alkaloidtartalma egyetlen kombináció esetében sem mutatott szignifikáns eltérést, ami arra utal, hogy a hidegtűrő egyedek alkaloidtartalmuk alapján nem különböznek az érzékenyekétől (11.táblázat).

11. táblázat A különböző keresztezési kombinációk F2 nemzedékeinek alkaloidtartalma a tavaszi vetésű teljes és az őszi vetésű, áttelelt részpopulációiban*

Kombináció	tavaszi vetésű teljes populáció	őszi vetésű, áttelelt rész- populációi	t-érték	szign.szint (p)
	átlag			
Leila x Ametiszt	4,16	4,54	-0,599	0,550
Przemko x Kozmosz	6,58	3,48	-0,905	0,368
Kozmosz x Minoán	11,46	11,06	0,335	0,738
Medea x Kozmosz	12,21	10,90	0,810	0,420
Medea x '67'	17,66	15,28	1,075	0,288
'H6' x '67'	16,88	15,48	0,562	0,576
'H6' x Kozmosz	13,02	11,63	0,871	0,387

*az áttelelt parcellákon is reprezentatív egyedszámot adó kombinációkat tüntettük fel.

Eredményeink szerint a megmaradt részpopulációkban az egyedek eloszlása megerősíti ezt a tapasztalatot. A teljes F2-höz képest az őszi vetésből megmaradt részpopuláció a különböző kombinációkban változó arányban tartalmazott olyan egyedeket, amelyek átlagos

alkaloidtartalmat meghaladó felhalmozási szinttel rendelkeztek (12.táblázat). A detektált maximum értékekről sem állítható, hogy egyöntetűen túlsúlyban lennének az őszi vagy a tavaszi vetésű populációban. Ennek alapján nem lehet egyértelmű következtetést levonni, hogy az áttelelés folyamán bekövetkező természetes szelekció bármilyen irányban is eltolná az alkaloidszintet.

12.táblázat *Az alkaloidtartalom szélső értékei és az átlag feletti hatóanyagtartalmú egyedek aránya (ÁF) a tavaszi vetésű teljes és az őszi vetésű, áttelelt F2 részpopulációkban **

Kombináció	tavaszi vetésű teljes populáció			őszi vetésű, áttelelt részpopuláció		
	Min.	Max.	ÁF (%)	Min.	Max.	ÁF (%)
Leila x Ametiszt	0,00	19,00	33	0,10	15,00	46
Przemko x Kozmosz	0,00	22,00	33	1,50	20,50	40
Kozmosz x Minoán	1,10	26,00	51	0,00	35,00	40
Medea x Kozmosz	3,00	25,00	52	0,00	31,50	48
Medea x '67'	9,00	28,00	47	0,00	32,00	39
'H6' x '67'	5,10	35,00	50	6,50	29,10	40
'H6' x Kozmosz	0,50	32,00	50	1,00	29,00	37

*Az áttelelt parcellákon is reprezentatív egyedszámot adó kombinációkat tüntettük fel.

Összességében megállapítható, hogy a mák alkaloidfelhalmozódása és hidegtűrése között nem igazolható határozott kapcsolat. A gyakorlati megfigyelés, miszerint az őszi fajták alkaloid felhalmozó képessége gyengébb, csupán abból adódhat, hogy az –egyébként igen szegényes – őszi fajtaspektrum korábban kizárólag étkezési, zömében házikerti célú termesztést szolgált, s a hatóanyagfelhalmozás növelése nem is volt nemesítési cél. Eredményeink azonban azt bizonyítják, hogy célirányos nemesítői munkával mind alacsony, mind magas hatóanyagú, azaz mind ipari, mind étkezési célra alkalmas genotípusok előállíthatók megnövekedett fagytolerancia mellett is. Ez jelentősen növelheti a hazai máktermesztés versenyképességét és a termelői igényekhez, lehetőségekhez való igazodást.

3. Új alkaloidspektrumú, fagytoleráns genotípusok

A keresztezéses eljárás a rendszeresen egyedszelekcióval fenntartott fajták továbbfejlesztése érdekében a variabilitás növelését szolgálhatja. A pályázati célkitűzésben megfogalmazottak szerint a keresztezések során előállított és tesztelt növényanyagot ezért olyan szempontból is megvizsgáltuk, hogy mód van-e feltételezhetően jó télálló és ugyanakkor speciális alkaloidtartalmú vonalak kiemelésére. E vonalak kiindulást jelentenek új, őszi vetésre alkalmas, ipari vagy étkezési fajták nemesítéséhez.

Az eredetileg magas hatóanyagtartalmú genotípusok F2 utódnemzedékeinek vizsgálata során kiválasztottuk a fajtaelőállítás alapanyagaként perspektivikus, potenciálisan gazdasági jelentőséggel bíró típusokat illetve emellett olyanokat is, amelyeknek szokatlan spektruma miatt elsősorban tudományos jelentősége lehet (13. táblázat).

A magas hatóanyagú keresztezések közül fontosak lehetnek azok az egyedek, ahol az összalkaloid tartalom a 25-30%-et is eléri. Bár minden kombinációban van erre példa, kiemelhető a 'Minoán' x 'Kozmosz' szülői páros. Az alacsony hatóanyagú fajták keresztezése során a legmagasabb összalkaloid tartalom is eléri egyes esetekben a 20% -et, de a gyakorlatban ezek feltehetően nehezebben rögzíthetők (ld. fentebb). E kombinációkban viszont minden párosításból született számos egyed, amelyek alkaloidtartalma a

kimutathatósági szint alatti vagy legfeljebb nyomnyi, s ezek az étkezési mák nemesítésében rendkívül érdekesek lehetnek.

Tudományosan érdemes tovább vizsgálni a különböző alkaloidokat azonos arányban felhalmozó, vagy a tebaint csak nyomnyi morfinnal tartalmazó típust, továbbá a magas narkotinos anyagokból született narkotinmentes egyedeket. Segítségükkel további információkat kaphatunk a mákalkaloidok bioszintéziséről és annak szabályozásáról.

A kiemelt egyedeket elsősorban az áttelelt populációból válogatjuk ki, hiszen ezek a fagyűrésre már erős szelekciós nyomás alatt álltak. További támpontot ad a klímakamrás teszt sorozat, ahol –bár nem az egyed szintjén- de a kombinációra vonatkozóan rendelkezünk adatokkal (ld. 1.2 fejezet). Minden esetben azonban a klímakamrás provokatív feltételek között tervezzük tovább tesztelni a felszaporított anyagokat.

13.táblázat *Néhány perspektivikus illetve érdekes egyed hatóanyag spektruma az F2 nemzedékekből (%)*

Jellemző típus	morfin	kodein	tebain	narkotin	Kombináció
Magas hatóanyag keresztezésekből perspektivikus					
morfinos	15	-	-	-	Minoán x Kozmosz
vegyes	13	7	8	-	Minoán x Kozmosz
	12	2	4	5	Minoán x Kozmosz
	15	5	12	-	67 x Medea
	12	3	15	-	Kozmosz x Medea
narkotinos	5	ny	-	15	H6x67
	18	ny	6	16	Minoán x Kozmosz
Alacsony hatóanyag keresztezésekből perspektivikus					
vegyes	13	1	9	-	Przemko x Kozmosz
alacsony (mentes)	-	-	-	-	Pl. Ametiszt x Leila
Tudományosan érdekes					
vegyes	2	1	3	3	67 x Medea
tebainos	0,5	2	7	-	67 x Medea
narkotin mentes	11	2	2	-	H6 x 67
narkotinos	1	-	-	8	Przemko x Leila

4. Összefoglalás

Munkánk során azt tűztük ki célul, hogy egyik legfontosabb gyógy- és élelmisznövényünk, a mák áttelelt genotípusainak tudományosan eddig alig vagy egyáltalán nem ismert kémiai-genetikai-élettani tulajdonságait feltárjuk. A munka során tíz mákfajtát/törzset és ezek F1, F2 hibrid generációit tanulmányoztuk in vitro és szabadföldi körülmények között.

A fagyűrési vizsgálatokhoz kidolgoztunk egy reprodukálható, klímakamrás hidegtűrési tesztprogramot az „ősz” és „tavasz” jellegű genotípusok elkülönítésére. Megállapítottuk, hogy a fagyűrést a mákban valószínűleg dominancia hatások szabályozzák, ami F2-ben csökken. Az utódok fagyűrése a toleráns és a szenzitív szülőtől is függ.

Igazoltuk, hogy hidegedzés a mákban a prolinszint –akár sokszoros- növekedését indukálja, ami a fagyűrő genotípusokban erőteljesebb. A különbség azonban edzés előtt nem jelentős, és mind az őszi, mind a tavaszi csoportban vannak eltérések a fajták közt.

A hidegedzés során az oldható cukrok (szacharóz, fruktóz, glükóz, stb.) koncentrációja is jelentősen megnő, a komponensek spektruma átalakul, de nem állapítható meg szignifikáns eltérés a tavaszi illetve őszi ökotípusú mákfajták között.

Több ezer egyedi analízis alapján összefüggéseket állapítottunk meg az alkaloidszint, ezen belül a morfin, kodein, tebain illetve narkotin öröklődésére és az egyes vegyületek korrelációira vonatkozóan.

A mák alkaloidfelhalmozódása és hidegtűrése között –klímakamrás és szabadföldi kísérletek alapján- nem igazolható határozott kapcsolat. Így célirányos nemesítéssel előállíthatók mind ipari, mind étkezési célra alkalmas, megnövekedett fagytoleranciájú genotípusok.

Az előállított populációkból kiválasztottunk a fajtaelőállítás céljára perspektivikus illetve szokatlan spektrumú, tudományos szempontból érdekes vonalakat.

Idézett irodalom:

Jaleel, A. C.; Manivannan, P.; Sankar, B.; Kishorekumar, A.; Gopi, R.; Somasundaram, R.; Panneerselvam, R. (2007): Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Cataranthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 60(1): 110-116.

Allen, R.- Millgate, A.- Chitty, J.- Thisleton, J.- Miller, J.- Fist, A.- Gerlach, W.- Larkin, P. (2004): RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy, Nature Biotechn. 22 (12), p. 1559-1565.

Bates L.S., (1973): Rapid determination of free proline for water-stress studies, Plant and Soil 39, 205-207.

Bernáth, J.- Németh, É. (2010): Breeding of poppy. In: Oil crop breeding- Springer Series „Handbook of Plant Breeding” (ed. Vollmann, J.- Rajcan, I.), Springer Verlag- Life sciences, New York, /In press/

Facchini, P. J.; Hagel, J. M.; Liscombe, D. K.; Loukanina, N.; MacLeod, B. P.; Samanani, N.; Zulak, K. G. (2007): Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory. Phytochem Rev. 6: 97-124.

Galiba, G.- Vágújfalvi, A.- Chengxia, Li- Soltész, A.- Vashegyi, I.- Cattivelli, L.- Dubcovsky, J. (2008): Molekuláris modell a fagyállóság és a vernalizációs igény kölcsönhatásának értelmezésére. Hagyomány és haladás a növénynemesítésben, ISBN 978-963-508-575-0. MTA Agrártud. Osztály növénynemesítései Bizottság. p. 140-145.

Gusta, L. V.; Wisniewski, M.; Nesbitt, N. T.; Gusta, M. L. (2004): The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. Plant Physiology. 135(3): 1642-1653.

Hare, P. D.; Cress, W. A.; Van Staden, J. (1998): Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant, Cell and Environment. 21: 535-553.

Kacperska-Palacz, A. (1978): Physiological mechanisms of frost tolerance in plants. Acta Horticulturae. 81: 23-35.

Leung, J.; Giraudat, J. (1998): Abscissic acid signal transduction. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 199-222.

Nakashima, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006): Regulons involved in osmotic- and cold-stress-responsive gene expression in plants. *Physiologia Plantarum*. 126: 62-71.

Németh, É.- Bernáth, J.- Sztefanov, A.- Petheő F. (2002): New results of poppy (*Papaver somniferum* L.) breeding for low alkaloid content in Hungary, *Acta Horticult.*, No. 576, 151-158.

Palva, E. T.; Welling, A.; Tähtiharju, S.; Tamminen, I.; Puhakainen, T.; Mäkelä, P.; Laitinen, R.; Li, C.; Helenius, E.; Boije, M.; Aspegren, K.; Aalto, O.; Heino, P. (2001): Cold acclimation and development of freezing and drought tolerance in plants. IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Tampere, Finland, *Acta Horticulturae* 560, p. 277-284.

Petrova, T; Todorov, I; Yougovich, Z; Penchev, E. (1997): Combining ability of Bulgarian and Serbian winter wheat varieties for frost resistance. *Proceedings of the International Symposium on Cereal Adaptation to Low Temperature Stress in Controlled Environments*. Martonvásár, Jun. 2-4., p. 127-130.

Pržulj, N.; Mladenov, N.; Denčić, S.; Kraljević-Balalić, M.; Momčilović, V. (1997): Possibility of barley selection in early generations resistant to low temperatures. *Proceedings of the International Symposium on Cereal Adaptation to Low Temperature Stress in Controlled Environments*. Martonvásár, Jun. 2-4., p. 255-259.

Rohde, P.; Hinch, D. K.; Heyer, A. G. (2004): Heterosis in the freezing tolerance of crosses between two *Arabidopsis thaliana* accessions (Columbia 0 and C24) that show differences in nonacclimated and acclimated freezing tolerance. *Plant Journal*. 38(5): 790-799.

Stone, J. M.; Palta J. P.; Bamberg J. B.; Weiss, L. S.; Harbage, J. F. (1993): Inheritance of freezing resistance in tuber-bearing *Solanum species*: evidence for independent genetic control of nonacclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(16): 7869-7873.

Thomashow, M. F. (1999): Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.

Vágújfalvi A.; Aprile, A.; Miller, A.; Dubcovsky, J.; Delugu, G.; Galiba G.; Cattivelli, L. (2005): The expression of several Cbf genes at the Fr-A2 locus is linked to frost resistance in wheat. *Mol Genet Genomics*. 274: 506-514.

Veisz O. (1997): Studies on the frost resistance of winter cereals in the Martonvásár phytotron. *Proceedings of the International Symposium on Cereal Adaptation to Low Temperature Stress in Controlled Environments*. Martonvásár, Jun. 2-4., p. 109-115.

Wiśniewski, K.; Zagdańska, B.; Prończuk, M. (1997): Interrelationship between frost tolerance, drought and resistance to snow mould (*Microdochium nivale*). *Proceedings of the International Symposium on Cereal Adaptation to Low Temperature Stress in Controlled Environments*. Martonvásár, Jun. 2-4., p. 221-226.